



THE UNITED STATES PATENT
AND TRADEMARK OFFICE

Serial No. : 10/609,181
Applicants : Mayumi SUGIMOTO et al.
Filed : June 26, 2003
For : METHOD FOR GENE DIAGNOSIS
OF BOVINE Hsp70 DEFICIENCY
Art Unit : 1632
Docket No. : 03279/HG
Customer No.: 01933
Confirmation No.: 1580

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify this
correspondence is being
deposited with the United
States Postal Service with
sufficient postage as First
Class mail in an envelope
addressed to:
Commissioner for Patents,
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
on the date noted below.

Richard S. Barth
Attorney: Richard S. Barth

Dated: February 3, 2004

In the event that this Paper
is late filed, and the
necessary petition for
extension of time is not filed
concurrently herewith, please
consider this as a Petition
for the requisite extension of
time, and to the extent not
tendered by check attached
hereto, authorization to
charge the extension fee,
or any other fee required
in connection with this
Paper, to Account No. 06-1378.

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

S I R :

Enclosed is a Certified Copy; priority is claimed
under 35 USC 119:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filing Date</u>
JAPAN	2002-327856	November 12, 2002 .

Frishauf, Holtz, Goodman
& Chick, P.C.
767 Third Ave., 25th Floor
New York, NY 10017-2023
Tel. Nos. (212) 319-4900
(212) 319-4551/Ext. 219
Fax No.: (212) 319-5101
E-Mail Address: BARTH@FHGC-LAW.COM
RSB/ddf
Enc.

Respectfully submitted,

Richard S. Barth

Richard S. Barth
Reg. No. 28,180

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年11月12日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-327856

[ST.10/C]:

[JP2002-327856]

出 願 人
Applicant(s):

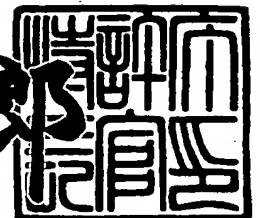
独立行政法人家畜改良センター
社団法人畜産技術協会



2003年 6月17日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3047246

【書類名】 特許願

【整理番号】 P141292K

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61B 5/00
C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 福島県西白河郡西郷村大字米字中山前 2 3 0 番地

 【氏名】 杉本 真由美

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道幕別町札内豊町 3 1 - 1 5

 【氏名】 古岡 秀文

【発明者】

 【住所又は居所】 福島県西白河郡西郷村大字米字中山前 2 3 0 番地

 【氏名】 杉本 喜憲

【特許出願人】

 【持分】 080/100

 【識別番号】 301029403

 【氏名又は名称】 独立行政法人 家畜改良センター

 【代表者】 理事長 南波 利昭

【特許出願人】

 【持分】 020/100

 【識別番号】 595038556

 【氏名又は名称】 社団法人 畜産技術協会

 【代表者】 山下 喜弘

【代理人】

 【識別番号】 100074077

 【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 藤郎
【選任した代理人】
【識別番号】 100086221
【弁理士】
【氏名又は名称】 矢野 裕也
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009014
【納付金額】 4,200円
【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 0 2 0 / 1 0 0
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0106326
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号1に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

【請求項2】 遺伝子増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応法によって行われる請求項1に記載の遺伝子診断法。

【請求項3】 変異の存在をポリメラーゼ連鎖反応法による遺伝子増幅産物を調べることにより行う請求項1または2に記載の遺伝子診断法。

【請求項4】 核酸試料がゲノミックDNA、cDNA、又はmRNAを含む試料である請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子診断法。

【請求項5】 被検ウシからゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離し、常法により該遺伝子の塩基配列を決定し、該塩基配列を配列表の配列番号1に記載の正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの塩基配列と比較して変異の有無を調べることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

【請求項6】 ウシのHsp70 欠損症を検出するためのキットであって、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅反応により増幅するのに利用されるオリゴヌクレオチドプライマーを含有しており、しかも該オリゴヌクレオチドプライマーが、

(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5' 末端の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び

(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3' 末端の領域に対する

相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

からなる群から選ばれたものであることを特徴とするウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【請求項7】 オリゴヌクレオチドプライマーが、15～35個のヌクレオチドからなるものである請求項6記載のキット。

【請求項8】 オリゴヌクレオチドプライマーが、配列表の配列番号2～8に示された群から選ばれた1対（ただし、配列番号2と4、3と5および6と7の組み合わせを除く）のものであることを特徴とする請求項6記載のウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法（又は検出方法）に関する。

【0002】

本明細書において、「Hsp70」はHsp70 遺伝子が転写され翻訳されて生成したタンパク質を意味し、「Hsp70 遺伝子」はHsp70 をコードしている翻訳領域のエクソン部分、隣接している非翻訳領域のエクソン部分、それらのイントロン部分、該遺伝子の発現の制御に関わる領域に加え、本疾患に関連する変異部分が含まれるDNA の領域を意味する。

【0003】

【従来技術】

Hsp70 欠損症は、横隔膜筋症を主徴とする常染色体性劣性遺伝病であり、臨床的には鼓張症、呼吸不全などを呈し、病理組織学的特徴としては横隔膜筋に筋繊維変性およびコア様構造が認められる疾患である。本疾患は、ホルスタイン牛においては1994年以降発生が認められているが、ヒトにおいて同様な疾患の報告はない。

Hsp70 欠損症を発症したウシは、鼓張症を繰り返すため、発見することができる。しかし、一方の染色体上にのみ異常に関連した遺伝子を有するヘテロ接合体であるウシ、すなわち遺伝的にHsp70 欠損症のキャリアーであるウシについては

、その異常を知ることが難しい。

したがって、見かけ上は異常の認められないウシ同士を交配させた場合でも、生まれてくる子牛に異常が現れることがあり、本疾患の発生を未然に防ぐ上では問題を有している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

ウシのHsp70 欠損症を予防する手段の1つとして、ヘテロ接合体同士の交配を避けるという方法が考えられる。しかし、この方法を可能にするためには、ウシのHsp70 欠損症の診断を遺伝子レベルで行い、疾患遺伝子のキャリアーを特定する必要がある。異常を持つウシの疾患遺伝子が、正常なものに比べてどのように変異しているかを明らかにし、様々な遺伝子工学的手法により、変異遺伝子を迅速に検出できる手段を得ることができれば、このような遺伝子診断法を確立することができる。

【0005】

したがって、本発明の目的は、ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法（遺伝子検出法）を提供することである。これにより、Hsp70 欠損症のキャリアーをスクリーニングすることによって、今後の本疾患の発生を未然に防ぐことができる。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記目的を達成するために研究を重ねた結果、本疾患と密接に関連する約11kbに及ぶDNA の欠損を見出すことに成功した。この欠損領域には、既にウシで報告されているHsp70 遺伝子 (M. D. Groz et al., Genomics, 14, 863-868 (1992); J. A. Gutierrez et al., Biochem. J., 305, 197-203 (1995)) を含んでいた。

さらに、本発明者らは、DNA の欠損という変異によりHsp70 が発現していないことが本疾患の原因であることを見出し、該遺伝子上に設定した特定のオリゴヌクレオチドプライマーを含む、オリゴヌクレオチドプライマーを用いる PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法により、かかる変異が検出されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

本発明並びにその態様を以下に示す。

(1) 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号1に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

(2) 遺伝子増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応法によって行われる請求項1に記載の遺伝子診断法。

(3) 変異の存在をポリメラーゼ連鎖反応法による遺伝子増幅産物を調べることにより行う請求項1又は2に記載の遺伝子診断法。

(4) 核酸試料がゲノミックDNA、cDNA、又はmRNAを含む試料である請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子診断法。

【 0 0 0 8 】

(5) 被検ウシからゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離し、常法により該遺伝子の塩基配列を決定し、該塩基配列を配列表の配列番号1に記載の正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの塩基配列と比較して変異の有無を調べることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(6) ウシのHsp70 欠損症を検出するためのキットであって、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅反応により増幅するのに利用されるオリゴヌクレオチドプライマーを含有しており、しかも該オリゴヌクレオチドプライマーが、

(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5'末端の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び

(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3'末端の領域に対する

相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

からなる群から選ばれたものであることを特徴とするウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

(7) オリゴヌクレオチドプライマーが、15～35個のヌクレオチドからなるものである請求項6記載のキット。

(8) オリゴヌクレオチドプライマーが、配列表の配列番号2～8に示された群から選ばれた1対(ただし、配列番号2と4、3と5および6と7の組み合わせを除く)のものであることを特徴とする上記(6)記載のウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【0009】

(9) ウシHsp70 遺伝子及びウシHsp70 欠損症の遺伝子に対応する塩基配列又はその相補鎖の全体又はその一部であって、

(a) 配列表の配列番号1で示された塩基配列又はその相補鎖の全体又はその一部、

(b) 前記配列(a)とハイブリッド形成し、PCRによりウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅するのに利用できるすべての配列、

(c) 遺伝子コードの縮退のために前記配列(a)及び(b)から派生した配列よりなる群から選ばれたものであることを特徴とする塩基配列。

(10) ゲノミック DNA配列、cDNA配列、RNA配列、ハイブリッド配列、合成配列、及び半合成配列からなる群から選ばれたものであることを特徴とする上記(9)に記載の塩基配列。

【0010】

(11) 上記(9)と(10)のいずれかに記載の塩基配列又は対応するmRNAとハイブリッド形成できることを特徴とするヌクレオチドプローブ。

(12) 上記(11)に記載のヌクレオチドプローブを用いてウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む配列を明らかにし、及び／又は単離する工程を有することを特徴とするウシHsp70 欠損症の検出方法。

(13) 上記(6)～(8)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(14) 上記(13)記載のオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とするウシのHsp70 欠損症用遺伝子診断試薬。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下において、本発明を詳細に説明する。

請求項1記載の本発明は、ウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法（検出方法）である。

後述するように、ウシHsp70 欠損症の原因となる遺伝子上の変異が解明された(図1(a))ことにより、この変異を利用して該疾患の検出を行うことができる。具体的なウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法（検出方法）としては、次のような工程を含む態様が例示される。すなわち、

- (a) ウシの核酸試料を得る工程、
 - (b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、
 - (c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、
- である。

【0012】

第1に、工程(a)について述べる。本発明に用いられるウシの核酸試料としては、Hsp70 をコードする塩基配列を有するものであれば特に限定されるものではなく、適当な細胞又は組織由来の核酸（全ゲノムDNA 及び細胞の全RNA から転写されたcDNAを包含する）、例えば、ゲノミックDNA、cDNA、mRNA等が挙げられる。ウシの核酸試料の調製は、公知の方法、例えばMolecular cloning, a laboratory manual (2nd edition) (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989))に記載の方法により行うことができる。

【0013】

第2に、工程(b)について述べる。工程(a)で得られた核酸試料および適当なプライマーを用いて、ウシHsp70 遺伝子に存在しうる変位部位を含む領域が増幅され、所望の核酸断片を得ることができる。

本工程で用いられる遺伝子増幅反応の方法としては、該領域を増幅できる方法であれば特に限定されないが、PCR 法、RNA ポリメラーゼを利用した核酸増幅法や鎖置換増幅法のような核酸増幅法を利用することができる。なかでもPCR 法が好ましく用いられる。

増幅の対象となる、変異部位を含む領域としては、ウシHsp70 遺伝子の塩基配列のうち、ウシHsp70 欠損症の原因となる変異を含んでいる領域であれば特に限定されず、例えば、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列の中の1997～11030 位を含む領域が挙げられる。

【0014】

本明細書中、「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」とは、一般的に米国特許第4683195 号明細書に記載されている方法を指し、例えば、所望の塩基配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。

一般に、PCR 法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2 個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うところのサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR 法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増殖されるべき塩基配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべき塩基配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべき塩基配列に隣接しているものが好ましく使用され得る。

【0015】

PCR 法は、M. A. Innis, D. M. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke & G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); R. K. Saiki et al., Science, 239, 487-491 (1988); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988) などに記載の方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法により行うことができる。

また、PCR 法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコールに従っ

て実施することもできる。

【0016】

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Agnew, C hem. Int. Ed. Engl., Vol. 28, p. 716-734 (1989)に記載されているような既知の方法、例えば、トリエステル法、ホスファイト法、ホスホアミダイト法、ホスホネート法などの方法により化学合成することができる。通常、合成は修飾された固体支持体上で便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有していてもよい。

【0017】

PCR 法で用いるプライマーとしては、上記の変異部位を含むDNA 断片を増幅できるものであれば、特に限定されない。代表的には、プライマーは(a) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(b) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、より好ましくは(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5' 端側の任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3' 端側の任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、例えば、3～100個、好ましくは10～50個、さらに好ましくは15～35個のヌクレオチドを含有するものが挙げられる。

また、PCR 条件についても特に限定されず、通常行われる公知の条件でよく、例えば、上記した文献の記載を参考に選択することができる。PCR においては、DNA 鎖の熱変性、プライマーのアニーリング及びポリメラーゼによる相補鎖の合成からなる一つのサイクルが、例えば、10～50回、好ましくは20～35回、より好ましくは25～30回繰り返して行われる。

【0018】

第3に、工程(c)について述べる。本工程において、工程(b)で得られる核酸断片について変異の存在を調べる。変異の存在の検出方法としては、特に限定されないが、PCR法により得られたDNA断片長を調べることにより検出する。

DNA断片長を調べる方法は特に限定されないが、ポリアクリルアミド又はアガロースゲル上の電気泳動によりDNA断片を分離し、例えば、既知分子量のマーカーDNAフラグメントの移動度に対してのその移動度に基づいて、目的のDNA断片を同定する方法が好ましい。

【0019】

上記以外の検出法としては、前記に例示された態様の工程(c)をその他の変異検出方法に変更した方法がある。変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA断片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法のような公知の変異検出方法が使用できる。さらに、増幅されたDNAを適当なベクターにクローニングして塩基配列を決定する方法や、あるいは増幅断片そのものを鋳型としてその塩基配列を決定する方法によっても変異の検出を行うことができる。

【0020】

オリゴヌクレオチドやプローブなどは、検出を容易にするためのラベル成分により標識されていることが好ましい。該ラベル成分は、分光学的手段、光学的手段、生化学的手段、免疫学的手段、酵素化学的手段、放射化学的手段などにより検出できるものであることができる。ラベル成分の例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、 ^{32}P などの放射性ラベル、アイソトープ、ビオチン、蛍光色素、発光物質、発色物質などが挙げられる。

【0021】

本発明のウシHsp70欠損症の遺伝子診断法(検出方法)により、Hsp70欠損症を発病しているウシのみならず、Hsp70欠損症のキャリアーのウシについても検出し、診断することができる。

したがって、本発明でいうウシHsp70欠損症とは、遺伝子的に異常であることを意味し、症状の有無を問わず、またキャリアーを含めて広義に解釈するものとする。

【 0 0 2 2 】

正常ウシ及びHsp70 欠損症発症ウシのHsp70 遺伝子の解析：

遺伝子上の変異と本疾患との関連を調べるために、まず正常なウシのHsp70 をコードする遺伝子 (cDNA) を単離し、その塩基配列を明らかにする。該遺伝子が単離された例はこれまで報告されていないが、本発明者らは、本疾患牛を含む家系のゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法と云われる手法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離した。すなわち、連鎖地図上に原因遺伝子座のマッピングを行ったのち、その染色体領域より原因遺伝子を単離する方法 (「動物遺伝育種学事典」、社団法人畜産技術協会発行) により実施した。

【 0 0 2 3 】

本発明により解明された正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの全塩基配列を配列表の配列番号 1 に示す。DNA 断片の塩基配列の決定 (シーケンシング) は、化学分解法 (Maxam & Gilbert 法)、チェーンターミネーター法 (Sangerジデオキシ法) などにより行うことができる。

【 0 0 2 4 】

Hsp70 欠損症の原因となる遺伝子上の変異は、正常ウシ及び発症ウシのHsp70 遺伝子の塩基配列を比較することによって明らかにすることができる。すなわち、前記の正常ウシの場合と同様に発症ウシのHsp70 遺伝子の塩基配列を調べ、これを正常ウシ遺伝子の塩基配列と比較することにより、該疾患の原因である変異を確認することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明ではHsp70 欠損症ウシのHsp70 遺伝子上では配列表の配列番号 1 に示される正常ウシのHsp70 遺伝子上のHsp70 をコードする翻訳領域の塩基配列のうち 1997~11030 位の部分が欠損する変異を見出した (図 1 (a))。

図 1 (a) において、HSPA1AおよびHSPA1Bは、いずれもHsp70 遺伝子である。このHsp70 遺伝子は、ほとんど同じ配列の 2 つの遺伝子が染色体上に横並びしているものから成る。また11kbの欠損部位は、HSPA1Aの3' 側の非翻訳領域から始まり、HSPA1Bの翻訳領域の3' 側末端で終わる。

【 0 0 2 6 】

【実施例】

以下、本発明を実施例をもってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。以下の記載では、特に説明がない場合には、D. M. Glover & B. D. Hames (Ed.), DNA Cloning 1, Core Techniques (2nd edition), A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford (1995); J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); M. A. Innis, D. M. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke & G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991) に記載の方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法により行われている。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明がない場合、それらに添付のプロトコルの指示に従って行っている。

【0027】

実施例 1

(1) 正常ウシHsp70 遺伝子の塩基配列の決定

Hsp70 欠損症の疾患牛（12頭）及びそれらの両親／娘牛からなる家系について、多型性DNA マーカーを用いてHsp70 欠損症と連鎖するウシ染色体の領域を決定した。すなわち、連鎖地図上にあるDNA マーカーのうち疾患と最も強く連鎖するマーカーを選抜した。ウシの人工大腸菌染色体(BAC) ライブラリー [CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND - BACPAC RESOURCES製] からこの領域に存在するBAC クローンを分離した。

このBAC のクローンを材料にショットガン塩基配列決定法を行った。まず、ネブライザーで物理的にBAC クローンのDNA を約700 bpの大きさに細断し、両端をDNA ポリメラーゼで平滑にし、プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドクローンから無作為に選び、それぞれ両端からBigDye Terminator Cycle Sequencing試薬(PE バイオシステムズ社製) により、3700蛍光DNA シークエンサー(PEバイオシステムズ社製) を用いてその塩基配列を決定した。得られた塩基配

列を配列表の配列番号 1 に示す。この塩基配列を他の既知の遺伝子 (GenBank のデータベースに登録されており、塩基配列が決定されている遺伝子) と比較したところ、Hsp70 遺伝子であることが判明した。

【 0 0 2 8 】

(2) Hsp70 の発現

筋肉を磨り潰したものを遠心することによって得られる上清である可溶画分を該疾患牛の横隔膜筋から調製し、Hsp70 の発現について常法に従って調べた。すなわち、可溶画分を、SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、Hsp70 に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製) をプローブにして Hsp70 の発現を調べるウェスタンブロットを行ったところ、正常ウシに比べ該疾患牛ではほとんど発現していないことが明らかとなった。

【 0 0 2 9 】

(3) Hsp70 欠損症ウシ Hsp70 遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 (2) に述べたように、Hsp70 欠損症ウシでの Hsp70 の発現が認められないことから、該疾患牛の Hsp70 遺伝子の塩基配列を決定した。すなわち、配列表の配列番号 1 の配列を参照しつつ PCR を行い、Hsp70 欠損症ウシにおける Hsp70 遺伝子の DNA 塩基配列を決定した。

このようにして決定された塩基配列を、前記の正常ウシについて決定されたものと比較した結果、Hsp70 欠損症ウシの Hsp70 遺伝子では、配列表の配列番号 1 に示された塩基配列中、1997～11030 位を含む約 11 kb の欠損が認められた。このため、該疾患牛では Hsp70 の発現が見られないと考えられる。

【 0 0 3 0 】

実施例 2

Hsp70 正常型の検出：

ウシのゲノミック DNA 上の Hsp70 の正常型を確認するため、Hsp70 欠損症ウシに認められた欠損部位を含む DNA 断片を増幅するためのプライマー F1、R1、F2、R2 (配列表の配列番号 2 - 5) を配列表の配列番号 1 の塩基配列を基にして合成した。これらプライマーの塩基配列上の位置を図 1 (b) に示す。

【 0 0 3 1 】

正常ウシの血液、Hsp70 欠損症ウシの筋肉、及びその母牛又は娘牛の血液（抗凝固剤としてEDTA、ヘパリンを含む）より、QIAamp blood kit又はQIAamp tissue kit（QIAGEN社製）を用いてゲノミックDNA を調製した。

これらのゲノミックDNA を鋳型とし、プライマーF1とR1及びF2とR2を用いたPCR（Animal Taq を使用、94℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとした35サイクル反応）を行い、反応液を1.5%ゲル（1x TBE）を用いた電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して増幅DNA 断片を確認した。

正常ウシとHsp70 欠損症ウシの母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とした場合、図2(a)に示すように、422 bp及び198 bpのDNA 断片の増幅が見られた。しかし、Hsp70 欠損症ウシのゲノミックDNA を鋳型にした場合は、増幅が認められなかった。

【 0 0 3 2 】

実施例 3

Hsp70 変異型の検出：

ウシのゲノミックDNA 上のHsp70 遺伝子の変異型が有ることを確認するため、実施例1(3)に記載の約11 kb の欠損部分の両端にプライマーF3、F4、R3（配列表の配列番号6-8）を合成し（図1(b)）、実験に供した。

【 0 0 3 3 】

正常ウシ、Hsp70 欠損症ウシ、及びその母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とし、プライマーF3とR3及びF4とR3を用いたPCR（Animal Taq を使用、94℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとした35サイクル反応）を行い、反応液を1.5%ゲル（1x TBE）を用いた電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して増幅DNA 断片を確認した。

Hsp70 欠損症ウシ、及びその母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とした場合、図2(b)に示すように、2028 bp 及び2008 bp のDNA 断片の増幅が見られた。しかし、正常ウシのゲノミックDNA を鋳型にした場合は、増幅が認められなかった。

【 0 0 3 4 】

これらの結果より、Hsp70 遺伝子の翻訳領域を含む約11 kb の欠損について、発症ウシの母牛又は娘牛はこの変異に関してヘテロ接合体であり、Hsp70 欠損症が染色体性劣性遺伝をする遺伝性疾患であることが確認された。

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】

本発明によれば、遺伝子工学的手法により、ウシのHsp70 欠損症及びそのキャリアーを簡便、かつ迅速に検出し、診断することが可能である。また、そのために使用するキットが提供される。

【 0 0 3 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Livestock Technology Association

<120> Gene Diagnosis for Bovine Hsp70 Deficiency

<130> P141292K

<160>8

<210>1

<211>12988

<212>DNA

<213>Bovine

<400>1

```
acgtcgttga tcctgtgggc cgttttcagg tttgaagctt atctcggagc cgaaaaggca 60
gggcaccggc atggcgaaaa acatggctat cggcatcgac ctgggcacca cctactcctg 120
cgtaggggtg ttccagcacg gcaaggtgga gatcatcgcc aacgaccagg gcaaccgcac 180
cacccccagc tacgtggcct tcaccgatac cgagcggctc atcggcgatg cggccaagaa 240
ccaggtggcg ctgaaccgcg agaacacggt gttcgacgcg aagcggctga tcggccgcaa 300
gttcggagac ccggtggtgc agtcggacat gaagcactgg cttttccgcg tcatcaacga 360
cggagacaag cctaaggtgc aggtgagcta caaaggggag accaaggcgt tctacccgga 420
```

ggagatctcg tcgatggtgc tgaccaagat gaaggagatc gccgaggcgt acctgggcca 480
 cccggtgacc aacgcggtga tcaccgtgcc ggcctacttc Aacgactcgc agcggcaggc 540
 caccaaggac gcgggggtga tcgcggggct gaacgtgctg aggatcatca acgagcccac 600
 ggccgccgcc atcgcctacg gcctggacag gacgggcaag ggggagcgca acgtgctcat 660
 ctttgatctg ggagggggca cgttcgacgt gtccatcctg acgatcgacg acggcatctt 720
 cgaggatgaag gccacggccg gggacacgca cctgggcggg gaggacttcg acaacaggct 780
 ggtgaaccac ttcgtggagg agttcaagag gaagcacaag aaggacatca gccagaacaa 840
 gcgggccgtg aggcggctgc gcaccgcatg cgagcgggcc aagagaacct tgtcgtccag 900
 caccaggcc agcctggaga tcgactccct gttcgagggc atcgacttct acacgtccat 960
 caccaggcg cggttcgagg agctgtgctc cgacctgttc cggagcacc tggagcccgt 1020
 ggagaaggcg ctacgcgacg ccaagctgga caaggcgcag atccacgacc tggtcctggt 1080
 ggggggctcc acccgcatcc ccaagggtga gaagctgctg caggacttct tcaacgggcg 1140
 cgacctcaac aagagcatca accccgacga ggcggtggcg tacggggcg cggtgcaggc 1200
 ggccatcctg atgggggaca agtcggagaa cgtgcaggac ctgctgttgc tggacgtggc 1260
 tccccgtcg ctgggactgg agacggccgg aggcgtgatg accgccctga tcaagcgcaa 1320
 ctccaccatc cccacgaagc agacgcagat cttcaccacc tactcggaca accagccggg 1380
 cgtgctgac caggtgtacg agggcgagag ggccatgacg cgggacaaca acctgctggg 1440
 gcgcttcgag ctgagcgga tcccgccggc cccgcggggg gtgccccaga tcgaggtgac 1500
 cttcgacatc gacgccaatg gcatcctgaa cgtcacggcc acggacaaga gcacgggcaa 1560
 ggccaacaag atcaccatca ccaacgacaa gggccggctg agcaaggagg agatcgagcg 1620
 catggtgcag gaggcgaaa agtacaaggc ggaggacgag gtccagcgcg agagggtgtc 1680
 tgccaagaac gcgctggagt cgtacgcctt caacatgaag agcgccgtgg aggatgaggg 1740
 gctgaagggc aagatcagcg aggcggacaa gaagaagggt ctggacaagt gccaggaggt 1800
 gatttcctgg ctggacgcca acaccttggc ggagaaggac gagtttgagc acaagaggaa 1860
 ggagctggag caggtgtgta accccatcat cagcagactg taccaggggg cgggcggccc 1920
 cggggctggc ggctttgggg ctcagggcc taaagggggc tctgggtctg gcccaccat 1980
 tgaggaggtg gattaggaat ccttccctgg attgctcatg tttgttatgg agactgttgg 2040
 gatecaaggc tttgcattgc cttatatatc ttcctttcat cagccatcag ctatgcaagc 2100
 tgtttgagat gttgaactgt cccttttatg aaattaggaa ctcttttttc cagagtctta 2160

agtatagagc tgaatgtata gtgccatctt ttgtcagttt cttttttag tag tattcatgcc 2220
 aaactcaagc tatttttcac ccgtttctgt ttacttccaa gtaaataaac tcaaataatt 2280
 cgagtgatgt ttgcttctgt gtttttattt tgaagttaga aggatctgta gaggttgtct 2340
 gttttacagt atccaaaaat gaactgcaat tggcctctta gataaggta gggatccaga 2400
 aaagaatata gcattatgac acatttcttt taggcaaata gtatccttgg gaaacataaa 2460
 gctgctcatt tgaatggttg tgtttgtgaa tccagaaaat gttaagggtt actggcatgg 2520
 tagcctcaag gttgggcggg ggggtccatac ttacgggtg aactcaaaag gtgcctgtag 2580
 tggcagtatt cctggagaag caggcaaata agaggcagtt agattggaag tcatgggtgc 2640
 tgctgcttgt tagtacaggt gataccttag agccttggtta cttaatctag attcagcatg 2700
 aaagagaagg tgagtcctaa attggcactg aggaaatgtg aattctagta ctggcttgcc 2760
 taattatgca tgattgcgtt agccactgtg atcctcaagt ctacagttt aaaatggaag 2820
 ggtttggcct gatgctaaag ttttaatttct taaaagaatg ctgagataaa aatgctgcgt 2880
 ttccagtact ggttacctac attttaagta tcccagttag taccttagag aggtgtcact 2940
 gtttcatgcc ccagcaggag gacggacccc cagtatttca gtgtgcttac ctaccaggta 3000
 ctgtaccagg ggccttttac atgtttatta attccattc caccatattg agtataggca 3060
 gtgtttggct tccacagggtg gacgtatgtg gagacttaaa aggcaactggc ttaaatttat 3120
 tacaagggtta aaaaaacggg ttcagggaag atgttgaacc tggattccaa ctgaggtttt 3180
 attgtttttt gctctgctgc ccacagggtt ttgtgcatgt ctggttctgg gtctacccta 3240
 ggtttcacaa tcggtaatct ttctgctttg acaatgtata atcctaaaca actatgtcag 3300
 ataatacggg taatgctaga ggtttaatac tggtttaattt agaagagtga ttgaaaaaac 3360
 ctgcagcact gcaccaggaa gccttaacca caggcttctt tcccctgcag atgcttcttg 3420
 ctttaactgt tgctagaatt ctgggaagag tcccctccac agcctgtttg tgggaaaagg 3480
 cctggcacaa tcctcacgac ttggggagtg agccccctta aaaggcaatt ttatctgggg 3540
 attacagaga ttctggaacc aggtggaagt ggtgattgca caaactgggc tagggaccac 3600
 taaattctac actttaaaat ggtttatgtg aattcaccaa aagtagtttt taaaaaaaaa 3660
 ttgtgtcaac attctggaag aacactttgt gagtgtgtgt atctcaaggc ccaccaaatt 3720
 ttactactaa tacttgcatg agaagaaact cttaatggta ataacatgta gaggttagacc 3780
 tgctccctgta agtttggaag tggaaatcta agagatgctt agacttgag gccagcatat 3840
 aaacacaggt ttaatcctca gggtaggtga actgtagcac ggtggactgt agccacaatg 3900

tgagtcaccc ttcattggga tatgcggttg gaacacgacc tcctctaccc ccacagaact 3960
 gcagtaccat ctgtgactgt catctgcaga taatacaata actcttgaag cagtcaccct 4020
 acttttagggg gaggtggcaa gggatgggga gggtaggggtg gagattggga aagacctaac 4080
 aaacaccttt gataagagag attagggaata tctccagaaa ttaatttga gaaaatgagt 4140
 tcctatggct aaaccagtta agattatcag ggtgttttat taggaagtca atatataatg 4200
 ttactgcaca gtcccttgca cagactactt tgaaaataat caccttcaac atgaagctga 4260
 gggacaaaaga gaatgcaaag tcattcctgg agaaggtgat tgcggtagca gcaagaactc 4320
 ggggtggggg tgggggggag gaggtgcac aaggaaaaat aatggtcgat caaaaagcat 4380
 ttttaaaatc taacaccttc cctaattcca atctcaccta ctccctatg ccagccctga 4440
 aaaattagat tgttatggta atgtgactga ttttaaatcc aagatactac gttattaaca 4500
 catagttact cctgggtgtt aactggattc tgcattaaa aatgaaaagg ataccaaagc 4560
 aataacataa ttgtgagaga agtgcacaga agcatgggct ttcagttaaa ataatgggtt 4620
 ttcaggtgaa aagtcaacac tggcgatttc tgagggggcg agcctcaagg taggaataag 4680
 aaagggaac tgcattcatt ctttattcca actgatcacc ttaaatccat cccaagggt 4740
 caccgcgaaa gtatccagtg cagttcagta ggatatagca accccatcag tcctctccta 4800
 actccagctc acgtagagac gtttaagggt caggtatcgc agcgaattcg ggatgccgag 4860
 ccaacctgcc ccacccacg ggcgccagta ccgccagca ggaaatcgga ggaaaggga 4920
 cggcggggaa ggaggaggag cacacaggaa atacagggtg agggggcggg ggagtccaga 4980
 agatcagaat caccacagag gatcttcac ctttttacc gtccagacgt cccagggaga 5040
 gccagggact agattcggga gatgggacgg cggcagagag aagacagcaa gctccagct 5100
 gtagccaatc cctgccagg gctgcggctc accgcctct ggcggtgggg accttctagc 5160
 ttctggcaac ccaatccat ccgacttact tgtgtcagtt acaaacctgt ccagtgtttt 5220
 caccacaat attagcgagt ttgagggaata ctctaaaggt ctctccttta ctgactcctt 5280
 taatcccatt ttgaaaaaga accgaagaac gccggcaccg gccaggcaac tccgaggcca 5340
 gccccgccgt caggccccgc ccgctccat cggggtctta ctgctctgg ctcttgccc 5400
 ccgtttcggg ctgtgtcagg aactttctgg agctctctgg gctcagaggc ggggactggc 5460
 tcgtaggaac actcttcaac aaacaaactg cccacccaa gtctccctcc ctctctgt 5280
 taacagccga ccagtctgtg ataacgggaa ggggagacgg tcctgggaga acctggaagg 5580
 gccgaaaagg tggaagtgtg ggtgttgtcg ggggaagcgg cggagctggg ggtgcgtaga 5640

taggcgtgag tcagaagcaa cagcctggag gtgagtctcc gcaggtcaca ccccccatg 5700
 gtgcacgtag agccctggca ttactcttt actgtcgtcc atggttgttt ctgttcttct 5760
 ttatagagc gtggaacgat agggtttatg tgccagcatt gagaggagtc caaagtagaa 5820
 agtatgccga catgttagtt caatcaccgg ttccgtaatt acctgtctgg gtgatctggc 5880
 caagccacga aacctctgaa ctttgtgct catctttgaa aacagaaagg tttggctgaa 5940
 ggactctgcc taaaaatctg aagatagttt ttatggtaaa ccgaaagtat tactatcata 6000
 gtcctggtag taatcccaa cttgtaagc acctcagtaa gaaatgattg agagatgaga 6060
 ctcgagagag tgttacttca ataaaagaat gaagggcaca aacttttgag tacaactctg 6120
 tcacagccac tgaactagtc ttttaaataat tgtctttgta atccttgatg gtatcatact 6180
 atgaaataaa tattaattct aatttataca acttgtgtaa tttagttcat ttacacgtac 6240
 ttcatgttta agaaagaaaa acagcttcaa caaggagata gagtccagat acaaaccag 6300
 gtcttgccct tcccagtttt tcccccatg ctgctggaaa ttagcagagt tcccaggcct 6360
 ttgccacact tccctggtag atcagagggt gaagaatctg cccacagtgc aagagacctg 6420
 ggttctatcc ctgagtagag aagatcccct ggagaaggga atggcgaccc actccagtgt 6480
 tcttggtgtag aaaatcccat gggcagagga gcctggccgg ctacagtcca cggggtcaca 6540
 aaggagtcgg acatgactgg gtgactaaca ctgtcaggcc tttgcccttt gaaggttaca 6600
 aatgcctggc tcagggtctg cctgggtggct catcggtaaa gaatccgcct gccaatgcag 6660
 gagacacagg ttctattcct gatccaggaa gattcccaca tgtcctcgtt ccaaggagca 6720
 gctaagcctg tgtgccaaa ctattgagca cgtacagccc attctctgaa acaagagaag 6780
 ccaccacaat gagaagcctg cttaccccca actcaactag agaatagcct ctgctacca 6840
 caactagaga aaagcctctg tagcagcaga gatctagcac agccaaaaat aaaatgaaaa 6900
 aatgcctggc tctaggtgtc acattgttct cttttgcttc tgtctgaaaa acctagaatt 6960
 atactgtctt ttaaaaacaa atagacttga gaaaaacat actagatgaa aaactgtagg 7020
 aaaaaggaga gagaacaaaa aaagatcctg caacttcagg gtgaggacgg ctccccccgc 7080
 cccaccact tccttcctt ggcagttagc attcttgga gtctctctcc catccccaac 7140
 ccttaaattt taccctgtca cccggtcagg cttgggcaac cttaatcttg attcttcaa 7200
 aactaaacc cgattttaaa aaactaattc caaatgcat caaataaagt tgtgaaaagt 7260
 ctcttgggat tcttaaaatc tccttgctgc tgctgtact aagtcgttc agttgtgtcc 7320
 aactctgtgc aacccacag acggaagccc accaggctcc ccaatccctg ggattctcca 7380

ggcaagaaca ctggagtggg ttgccatttc cttctccaat gcatgaaagt gaaaagtga 7440
 agtgaagttg ctcaggagtc cgactcttag cgaccccatg gactgcagcc taccaggctc 7500
 ctccgttcat gggattttcc aggcaagaac actggagtgg gttgccattg cttcttagag 7560
 ttacactatt acactcattg atcatatata gaactataca tttgatcaac tgcttcaagt 7620
 ctagtcatca tttctgttga aagctcagtc atatacttgg taatacaaga aataataatc 7680
 ttgtgaaaca agcaaaatac aaatgggtata gttaataaca ttagtggaac taaaaggaga 7740
 tatttttagcc atgagcctcc cacaccagtt ttttttaaag attgtcaaga ctagggaatg 7800
 ggtacttaga gcagaaatct gatttttcat gtggttcaaa tgtgttacct taaaggattt 7860
 atcaggtaga aaaatacagc attcagtttg aattatagca cagctatctc cctgagatgc 7920
 tgtcaagagt cttgcagttg tgtagcaggg cttttctcat tatagagatc tcagaagtca 7980
 ataggtgaat agcctgatta tcatttaaag cttatgaaag ttgttaaggc ttagatatgg 8040
 tcaattacat cctccaacc cattgaaggc atgcacacgc gtgcgcacgc gcgcacacac 8100
 acacacacac acacacacgc tgctaaatgg tcatacacca aatctcctta ggcaccaatt 8160
 aaaccggtac ctgagttcct gccttgggaa gtgtccagtg ttaaaggaag acaaaattca 8220
 agagactctc ctcataggaa atggaaaaga aatacggata tttaggtttc cgggtcatcc 8280
 acagagagag acaacgcaaa gtgtaggtta atacagtgtg tagctgactg cttgattcat 8340
 gaaaaacagc attttcaagt ggctcccca ctcctccacc ccagcaacag caagatttga 8400
 ggccctatca cctgtctccc tgctgagcag tggagacaat gatgccctt gcttcaagcc 8460
 aatagaggaa gagaactgca aattttggag aggagagcga atccagaatt cctgctggta 8520
 gcagctgatg ggggagaagg caatggcaac ccactccagt gttcttgcct ggagaatccc 8580
 agggacgggg gagcctggtg ggctgctgtc tctggggctg cacagagtcg gacacaactg 8640
 aagtgactta gcagtagcag cagcagctga tggtagaggaa gacaggggag aggggatgag 8700
 gttaaggact tctctggagg tgaacacttc tctggaagtg ttcacaaact gggtaggctaa 8760
 gatggacgtt tggggaatcc cctttcagat actgcataaa gagatggaaa attcctgaag 8820
 ttttaaccagt ttgactagat taaggagggtg attcattgga gagccacacc tgaatgtaaa 8880
 aaaagttatc acctacctgc acagtgaag ataaaaatat tgctttaaca aatctgtata 8940
 tctgattaac ctgaacaaat tataaaataa actgaatacc ctcagatttc aggaagaggt 9000
 gtttgatgaa tggctgtgcg cgcgcgcgcg cgtgtgtgtg tacgtgtgta aacgtcagtt 9060
 aagcaaaagt gttcaaagcg agatttcttc cttttatcag aaattgcctc ctcaggtact 9120

tctctggtgg tccagaaggg ctaagactct gtagaggaga atgcaggcgg cctgggttcg 9180
atctctggtc aagaaaatag atcccacatg ctacaactaa gattgaccat gctacaacta 9240
aggcttagct attaatttta aaacaacaac aacaaaaccc cacaactgcc tcctccgact 9300
tgtgtgttta tgttttctat gctcaagaca tgtggatata gtaatgagtc tatttcattg 9360
gttgtgaatc ccctctacta tggctttaat gtccctcaca ttttactttt aggtgcctaa 9420
taagggatct tgcattgccc ataaaggaag aagaaacaaa agccaaaata aattaccaa 9480
tgtcactgta tttaaaacag gaaggaggct aacaacagaa agctgaaatc taggataaaa 9540
agttaaatgg acgaattaag tacacagcaa acaacctgaa cttttagagg agatagaacc 9600
taggtcctgc caacctttct caccttccag catcattcca gactgtttac aatgggccac 9660
ccgccaacca actatatagc atgctcttca aacaggactg aacgctcccc caccaccacc 9720
ctcgcaggct caccaccaca ccacatttac ttaaaagtag tggacagcct aggagccgca 9780
aatgacaagg cagaagaccg aattcgggac tcaggttaat ccaggcacca ctgatcatcc 9840
gaggctgaac caggaattta aaaggcacag aggaggggag ggggtgcgtcc gcacctgggg 9900
ctgggaaaga tgaggaatcc ggagaagcgc aaaggacagc taaatatcta tggaaaatat 9960
tttctttctc aagcccagtc cagcccaggg agaaaggag cagctctggg cggggacagg 10020
ggcgtgtggt ctccagccct gcccttccca cgctcccccg accgagcagg tcccttctaa 10080
ggcgttggga accttctaca atctaaaaac catataccta attgattttc ttctgaaaat 10140
taaaatttcc cctcccatct gaatagggtt aaagaggagc caaaacttaa acagcttcaa 10200
ctctctcctt ttccttccca ttttaaaaat aagatgggaa aagcgccgcg gatgaccaag 10260
gcatttctcg gacagcccg cgcctcggcg agccagccca aacgtggctg cttccatcag 10320
cgttagcctc cgatcactct ccttggccca cagatagcca accctcttcg agaaactcgg 10380
gaactttctg tattttggct gtcccggcag tcgtgtagcc ctttaattcta ctttaacca 10440
ccaaactaat ttgagccccg agatcctctc accgccctac aattaattac aagcccaggg 10500
ctgacccctc cagtcgactc caaactactt ggctggctgg tcgccaggaa accagagaca 10560
gagtgggtgg accttcccag cccctctccc cctctcctta ggactcctgt ttcctccagc 10620
gaatcctaga agagtctgga gagttctggg aggagaggca tccagggcgc tgattggttc 10680
cagaaagcca gggggcagga cttgaggcga aacccttga atattcccga cctggcagcc 10740
ccactgagct cggtcattgg ctgacgaagg gaaaaggcgg cggggcttga tgaagaatta 10800
taaacacaga gccgcctgag gagaaacagc agcctggaga gagctgataa aacttacggc 10860

ttagtccgtg agagcagctt ccgcagaccc gctatctcca aggaccgccc cgagggggcac 10920
 cagagcggtc agttttcggg ttccgaaaag cccgagcttc tcgtcgcaga tcctcttcac 10980
 cgatttcagg tttgaagctt atctcggagc cgaaaaggca gggcaccggc atggcgaaaa 11040
 acacagctat cggcatcgac ctgggcacca cctactcctg cgtaggggtg ttccagcacg 11100
 gcaaggtgga gatcatcgcc aacgaccagg gcaaccgcac cacccccagc tacgtggcct 11160
 tcaccgatac cgagcggctc atcggagatg cggccaagaa ccagggtggc ctgaacccgc 11220
 agaacacggt gttcgacgcg aagcggctga tcggccgcaa gttcggagac ccggtggtgc 11280
 agtcggacat gaagcactgg cttttccgcg tcatcaacga cggagacaag cctaaggtgc 11340
 aggtgagcta caagggggag accaaggcgt tctaccgga ggagatctcg tcgatggtgc 11400
 tgaccaagat gaaggagatc gccgaggcgt acctgggcca cccggtgacc aacgcggtga 11460
 tcaccgtgcc ggcctacttc aacgactcgc agcggcaggc caccaaggac gcgggggtga 11520
 tcgcggggct gaacgtgctg aggatcatca acgagcccac ggccgcccgc atgcctacg 11580
 gcctggacag gacgggcaag ggggagcgca acgtgctcat ctttgatctg ggagggggca 11640
 cgttcgacgt gtccatcctg acgatcgacg acggcatctt cgaggatgaag gccacggccg 11700
 gggacacgca cctgggcggg gaggacttcg acaacaggct ggtgaaccac ttcgtggagg 11760
 agttcaagag gaagcacaag aaggacatca gccagaacaa gcgggccgtg aggcggctgc 11820
 gcaccgcatg cgagcgggcc aagagaacct tgtcgtccag caccaggcc agcctggaga 11880
 tcgactccct gttcgagggc atcgacttct acacgtccat caccaggcg cggttcgagg 11940
 agctgtgctc cgacctgttc cggagcacc tggagcccgt ggagaaggcg ctacgcgacg 12000
 ccaagctgga caaggcgag atccacgacc tggctctggt ggggggctcc acccgcatcc 12060
 ccaaggtgca gaagctgctg caggacttct tcaacggcg cgacctcaac aagagcatca 12120
 accccgacga ggcggtggcg tacggggcgg cggtgcaggc ggccatcctg atgggggaca 12180
 agtcggagaa cgtgcaggac ctgctgttgc tggacgtggc tcccctgtcg ctgggactgg 12240
 agacggccgg aggcgtgatg accgccctga tcaagcgcaa ctccaccatc cccacgaagc 12300
 agacgcagat cttaccacc tactcggaca accagccggg cgtgctgatc cagggtgtacg 12360
 agggcgagag ggccatgacg cgggacaaca acctgctggg gcgcttcgag ctgagcggca 12420
 tcccgccggc cccgcggggg gtgccccaga tcgaggtgac cttcgacatc gacgccaatg 12480
 gcatacctgaa cgtcacggcc acggacaaga gcacgggcaa ggccaacaag atcaccatca 12540
 ccaacgacaa gggccggctg agcaaggagg agatcgagcg catggtgcag gaggcgaaa 12600

agtacaaggc ggaggacgag gtccagcgcg agagggtgtc tgccaagaac gcgctggagt 12660
 cgtacgcctt caacatgaag agcgccgtgg aggatgaggg gctgaagggc aagatcagcg 12720
 aggcggacaa gaagaagggtg ctggacaagt gccaggaggt gatttcctgg ctggacgcca 12780
 acaccttggc ggagaaggac gagtttgagc acaagaggaa ggagctggag caggtgtgta 12840
 accccatcat cagcagactg taccaggggg cgggcgggc cggggctggc ggctttgggg 12900
 ctcaggggcc taaagggggc tctgggtctg gcccacccat tgaggaggtg gactaggggc 12960
 cttacttttt gtctgtctgt agtagacc 12988

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>2

aaccccatca tcagcagact 20

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>3

cacagaagca aacatcactc g 21

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>4

gcattgccca taaaggaaga 20

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>5

tggaaggtga gagaaaggtt gg 22

<210>6

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>6

acgtcgttga tcctgtggg 19

<210>7

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>7

tatctcggag ccgaaaagg 19

<210>8

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>8

ggtctactac agacagacaa aaagtaagg 29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) Hsp70 欠損症ウシ由来のウシHsp70 遺伝子の欠損部分を示す図である。

(b) 欠損部分を検出するためのPCR プライマーの位置を示す。

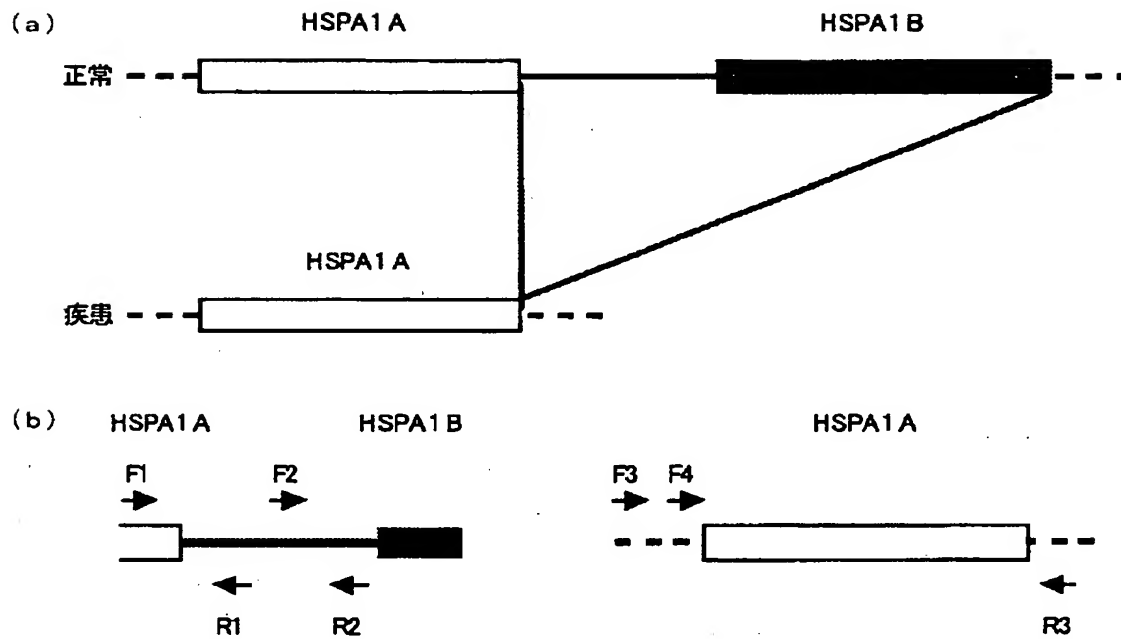
【図 2】

(a) Hsp70 正常型の検出：Hsp70 遺伝子の変異のないゲノミックDNA を鋳型とすれば、PCR で増幅することを示す電気泳動パターン図である。

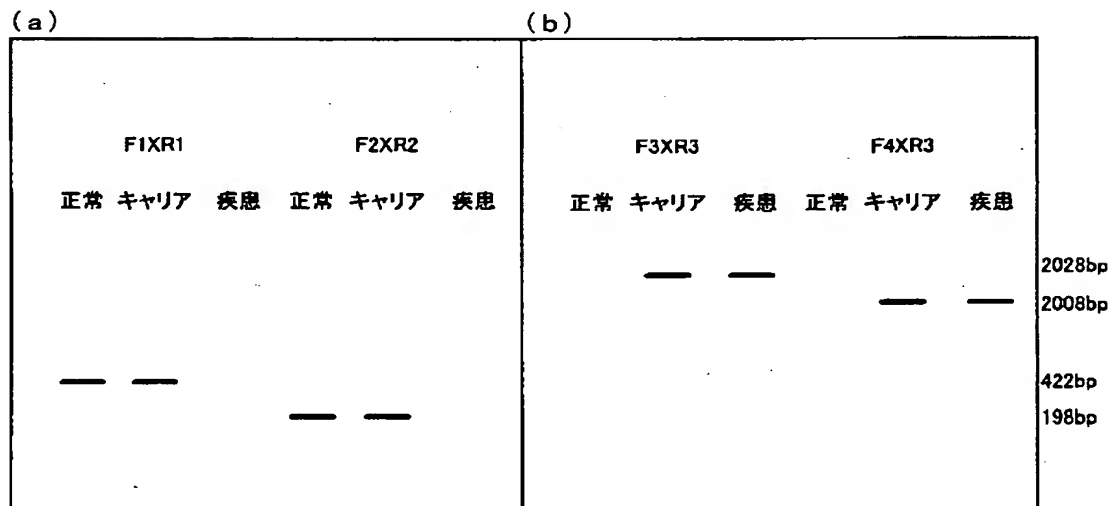
(b) Hsp70 変異型の検出：Hsp70 遺伝子の変異のあるゲノミックDNA を鋳型とすれば、PCR で増幅することを示す電気泳動パターン図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法を提供すること、具体的には対象遺伝子の周辺の領域を特異的に増幅せしめ、DNA 欠損を検知することにより診断を行う方法及びそのためのキットを提供すること。

【解決手段】 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号1に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-327856
受付番号	50201704587
書類名	特許願
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成15年 1月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年11月12日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301029403]

1. 変更年月日 2001年 5月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原1番地

氏 名 独立行政法人家畜改良センター

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595038556]

1. 変更年月日 1995年 2月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区湯島三丁目20番9号 緬羊会館
氏 名 社団法人畜産技術協会